

MATERIALS AND METHODS FOR MAKING IMPROVED LIPOSOME COMPOSITIONS

Publication number: JP2001521486T

Publication date: 2001-11-06

Inventor:

Applicant:

Classification:

- International: A61K9/127; A61K9/133; A61K47/48; A61K49/00; A61K49/15; A61K49/22; A61P17/02; A61P39/06; A61K9/127; A61K9/133; A61K47/48; A61K49/00; A61K49/06; A61K49/22; A61P17/00; A61P39/00; (IPC1-7): A61K9/127; A61K9/133; A61P17/02; A61P39/06

- European: A61K9/127B; A61K9/127P2; A61K47/48W6D; A61K49/00P4F; A61K49/18K8; A61K49/22P16

Application number: JP19970534660T 19970328

Priority number(s): US19960014363P 19960328; WO1997US05161 19970328

Also published as:

WO9735561 (A1)
WO9735560 (A1)
EP0914094 (A1)
EP0914094 (A4)
EP0914094 (A0)

more >>

Report a data error here

Abstract not available for JP2001521486T

Abstract of corresponding document: WO9735561

Provided are methods for preparing improved biologically active liposome products comprising a biologically active amphipathic compound in association with a liposome. Methods for producing the liposome products as well as methods of using the liposome products in therapeutic and diagnostic techniques are also provided.

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

(19)日本特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表2001-521486

(P2001-521486A)

(43) 公表日 平成13年11月6日 (2001.11.6)

(51)Int.Cl. ³	識別記号	P I	フワード (参考)
A 6 1 K 9/127		A 6 1 K 9/127	
9/133		9/133	
A 6 1 P 17/02		A 6 1 P 17/02	
39/06		39/06	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 47 頁)

(21)出願番号	特願平9-534030	(71)出願人	ザ ボード オブ トラスティーズ オブ ザ ユニバーシティ オブ イリノイ
(65) (22)出願日	平成9年3月28日 (1997.3.28)		アメリカ合衆国 61801 イリノイ
(85)翻訳文提出日	平成10年9月26日 (1998.9.26)		ベイナ サウス ライト ストリート
(86)国際出願番号	PCT/US 87/05161		201 ヘンリー アドミニストレーション
(87)国際公開番号	WO 97/35561		ビルディング 352
(87)国際公開日	平成9年10月2日 (1997.10.2)	(72)発明者	オンユケセル, ハヤット
(31)優先権主張番号	60/014, 363		アメリカ合衆国 60558 イリノイ ウエ
(32)優先日	平成8年3月28日 (1996.3.28)		スタン スプリングス クロウセン アベ
(33)優先権主張国	米国 (US)		ニュー 4146
(81)指定国	EP (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, L U, MC, NL, PT, SE), AU, CA, JP, U S	(74)代理人	弁理士 角田 嘉宏

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 改良リボソーム組成物を製造するための材料および方法

(57)【要約】

改良されたリボソーム組成物を得るための材料及び方法
リボソームと結合した生物学的に活性な同義塩基の化合物を含む、改良された生物学的活性リボソーム製造物を
調製するための方法が提供される。また、このリボソ
ーム製造物の医療上及び診断上の使用方法及び同時に、リボ
ソーム製造物の製造のための方法が提供される。

(2)

特表2001-521486

【特許請求の範囲】

1. リポソームに関連する生物学的活性両親媒性化合物を含む生物学的活性リポソーム製造物の調整方法であって、以下の工程を含む方法。
 - a) 水性性ポリマーと電子対共有して連結される少なくとも1つの脂質成分を含む、脂質の組み合わせをミキシングする工程、
 - b) この脂質の組み合わせから原子配置的に安定なリポソームを形成する工程、
 - c) 約300nm以下の平均直径を有するリポソームを得る工程及び
 - d) 生物学的活性両親媒性化合物が、上記工程c) から得られたリポソームと活性コンホメーションにて結合するような条件下で、上記工程c) から得られたリポソームを生物学的活性両親媒性化合物とともにインキュベートする工程。
2. 上記生物学的活性リポソーム製造物が単一層状のリポソームを含む請求の範囲第1項に記載の方法。
3. 多胞性のリポソームを形成する工程を含む請求の範囲第1項に記載の方法。
4. 上記多胞性のリポソームが、上記工程c) で得られるリポソームを生物学的活性ペプチドとともに遠心的に脱水及び再水和する工程を達成することにより製造される請求の範囲第3項に記載の方法。
5. 上記水性性ポリマーが、ポリエチレングリコール（PEG）である請求の範囲第1項から第4項のいずれかに記載の方法。
6. 上記両親媒性化合物が、その生物学的活性コンホメーション中に1又はそれ以上の α -又は ϵ -らせん状ドナーを有することによって特徴づけられる請求の範囲第1項に記載の方法。
7. 上記化合物が、バソアクティブインテスティナルペプチ（VIP）／ペプチドの成長ホルモン放出因子ファミリーの一種である請求の範囲第6項に記載の方法。
8. 上記ペプチドがVIPである請求の範囲第7項に記載の方法。
9. 上記工程c) にて得られるリポソームが、200nm以下の平均直径を有する請求の範囲第1項に記載の方法。

(3)

特表2001-521486

10. 上記工程c)にて得られるリボソームが、100nm以下の平均直径を有する請求の範囲第9項に記載の方法。

11. 上記リボソームが、選択された平均直径を有するリボソームを形成するような押し出しによって上記工程c)にて得られる請求の範囲第1項、第8項又は第9項に記載の方法。

12. 上記リボソームが、サイズ選択によって上記工程c)にて得られる請求の範囲第1項、第8項又は第9項に記載の方法。

13. 上記脂質の組み合わせが、さらなるコレステロール (Chol) の組み合わせにおける、電子対共有的にPEGと結合するジステアロイルホスファチジルエタノールアミン (PEG-DSPE)、ホスファチジルコリン (PC) 及びホスファチジルグリセロール (PG) からなる請求の範囲第1項に記載の方法。

14. 上記脂質の組み合わせが、0.5:5:1:3.5であるPEG-DSPE:PC:PG:Cholのモル比にて、コレステロールと結合している請求の範囲第13項に記載の方法。

15. 請求の範囲第1項から第14項のいずれかに記載の方法によって製造される生物学的に活性なリボソーム製造物。

16. 上記生物学的活性両親媒性ペプチドが抗酸化活性、傷治癒活性、しわ防止活性及び老化防止活性からなる群より選択された活性を有する、請求の範囲第15項に記載の生物学的活性リボソーム製造物を含む組成物。

17. 上記組成物が化粧品である請求の範囲第16項に記載の組成

物。

18. 上記組成物が治療用である請求の範囲第16項に記載の組成物。

19. 請求の範囲第15項に記載のリボソーム組成物を含み、さらに検出標識を含む診療用組成物。

20. 上記標識が、蛍光標識、放射性標識、色素及び磁気共鳴イメージングを高める化合物からなる群より選択される請求の範囲第19項に記載の診療用組成物。

21. 請求の範囲第19項に記載の診療用組成物を調製する工程、この組成物の

(4)

特表2001-521486

診療上効果的な量を標的組織に投与する工程、及び首反反射により標的組織での組成物の摂取を検出する工程を含む診療方法。

22、上記標識が、蛍光標識、放射性標識、色素及び磁気イメージ共鳴を高める化合物からなる群より選択される請求の範囲第21項に記載の診療用組成物。

23、請求の範囲第7項に記載の方法により製造され、その方法は生物学的活性リボソーム製造物をカプセルに入れる工程を含む、臓器疾患の治療のための経口制御放出製剤。

24、上記臓器疾患が、炎症性内臓疾患、慢性便秘、ヒルセウスブルング病、弛緩不能症、幼児性肥厚幽門狭窄症及び潰瘍からなる群より選択される請求の範囲第23項に記載の経口制御放出製剤。

25、請求の範囲第1項に記載の方法により得られる、リボソームに関連する生物学的活性両親媒性化合物を含む生物学的活性リボソーム製造物を調整する工程、

及び

このリボソーム製造物の治療に効果的な量を標的組織に投与する工程

を含む、標的組織に生物学的活性両親媒性化合物を投与する方法。

26、上記生物学的活性コンホメーションにおける両親媒性化合物が、1又はそれ以上の α -又は π -らせん状ドナーを有することによって特徴づけられる請求の範囲第25項に記載の方法。

27、上記ペプチドが、バソアクティブインテスティナルペプチド (VIP) /ペプチドの成長ホルモン放出因子ファミリーの一種である請求の範囲第26項に記載の方法。

28、上記ペプチドが、VIPである請求の範囲第27項に記載の方法。

29、請求の範囲第8項に記載の方法により製造されるリボソーム組成物にて臓器をインキュベートする工程を含む、移植のために身体の臓器、組織又は細胞タイプを保持するための方法。

30、炎症、高血圧、アテローム性動脈硬化、炎症性内臓疾患、慢性便秘、ヒルセウスブルング病、弛緩不能症、幼児性肥厚幽門狭窄症、潰瘍、細胞増殖促進

(5)

特許2001-521486

及び身体臓器内の傷治癒促進の治療用の医薬のための、生物学的活性両親媒性ペプチドを含み、そして請求の範囲第1項により製造される生物学的活性リポソーム製造物の用途。

31. 上記生物学的活性両親媒性ペプチドが、バソアクティブインテスチナルペプチド (VIP) / ペプチドの成長ホルモン放出因子 (GRF) ファミリーの一つである請求の範囲第30項に記載の用途。

32. 上記ペプチドがVIPである請求の範囲第31項に記載の用途。

(6)

特表2001-521486

【発明の詳細な説明】

改良リボソーム組成物を製造するための材料および方法

本出願は1996年3月28日出願の米国仮出願第60/014,363号に対する優先権を主張するものである。

発明の背景

本発明は一般的に生物学的に活性な組成物、さらに詳しくは、両親媒性、すなわち、親水性部分と疎水性部分の双方を有する化合物およびペプチドに関する。特に本発明は、診断および治療の両用途のためのリボソームに関連する両親媒性ペプチドの送達および提供のための改良法に関する。

本発明で特に注目するのは、血管作用性ペプチド（バソアクティブ・インテスティナル・ペプチド）（VIP）および成長ホルモン放出因子（GRF）を始めとするペプチド化合物のファミリーのメンバーである生物学的に活性な両親媒性ペプチドである。さらに特に本発明は、VIP/GRFペプチドファミリーのペプチドのメンバーおよび生物学的に活性なその類似体を含む改良リボソーム組成物の使用を通じて、VIP/GRFペプチドファミリーのペプチドを標的組織へ送達する改良治療法に関する。

VIPは、生物学的な作用の広範なプロフィールを示し、多量シグナル導入経路を活性化することが知られている28個のアミノ酸からなるスクレオチドである。Said, *Peptides* 5 (増補1):149-150(1984)並びにPaulおよびEhadi, *Neurochem. Int.* 23:197-214(1993)を参照のこと。二重らせんとしてのVIPのSchiff-Erdmanson様では、該らせんの対面上で無極性残基および極性残基が分離していることを明らかにし、また、VIPがMussioら, *Biochemistry* 27:8147-8181(1988)で報告されているゆがんだ α -ヘリックスとしてモデル化される

場合にも、この両親媒性特性は明らかである。らせんが形成するVIP類似対の傾向とそれらの生物学的活性の間の関係は、Bodanら, *Bioorgan. Chem.* 3:133-140(1974)に記載されている。水中でのVIPのスペクトル特性はランダムコイルのそれから成る。しかしながら、有機溶媒および皮イオン性脂質は分子内におけるらせん情報を導く。Robinsonら, *Biopolymers* 21:1217-1228(1983);hamodら, *Bio*

(7)

特表2001-521486

polymers 22:1003-1021(1983);およびBodanszkyら, *Bioorganic Chem.* 3:133-140(1974)を参照のこと。

両親媒性らせんを形成できる短いペプチドは、脂質二重層に結合、貫通していることが知られている。KaiserおよびKeszdy, *Ann. Rev. Biophysical Chem.* 15:561-581 (1987) およびSanson, *Prog. Biophys. Molec. Biol.* 55:139-235(1991)を参照のこと。実施例は、DeGradoおよびLear, *J. Am. Chem. Soc.* 107:7684-7689(1985)に開示されている(LKLLKL-)様ペプチドモデル、並びにWatahaおよびGwozdziński, *Chem-Biol. Interactions* 82:135-149(1992)に開示されている26残基bceベノム(venom)ペプチドであるメリニンを導く。可能性ある結合メカニズムとしては、極性アミノ酸とリン脂質ヘッド基の間の静電氣的相互作用によって仲介される二重層の表面と平行なペプチドモノマーの配列、および疎水作用による部分的に安定化された極性二重層コアへのペプチド集合体の挿入が含まれる。Sanson, *Prog. Biophys. Molec. Biol.* 55:139-235(1991)を参照のこと。

VIPは同族ペプチドのファミリーに属し、その他のメンバーとしては、ペプチドヒスチジニンソロイシン(PHL)、ペプチドヒスチジンメチオニン(PHM)、成長ホルモン放出因(GRF)、下垂体アダル酸シクラーゼ活性化ペプチド(PACAP)、セクレチンおよびグルカゴンが挙げられる。VIPと同様、VIP/GRFペプチドファミリーの他のメンバーおよび生物学的に活性なその類似体は、脂質二重層に結合できる両親

媒性らせんを形成することができる。VIP/GRFペプチドファミリーのメンバーの生物学的作用は、その細胞表面で発現する蛋白質受容体および細胞内受容体によって仲介されると確信されており、最近ではカルモジュリンがVIPに対する細胞内受容体である可能性があることが示された[Stallwoodら, *J. Bio. Chem.* 267:19617-19621(1992);およびStallwoodら, *FASEB J.* 7:1054(1993)]。

VIPのin vivo作用を制限する主たる要因は、ほとんどが蛋白質分解性の変性、加水分解および/またはそのペプチドに採用された多様なコンホメーションのために、標的組織での生物学的利用能の低下であった。VIP単独および/またはVIP-カルモジュリン混合物の細胞内送達は、ペプチドの細胞表面結合に対する要求

(8)

特許2001-521486

を回避し、かくしてペプチドの生物学的作用を促進することができると推測されている。リボソームの脂質二重層は細胞の原形質膜と融合し、捕捉された内容物を細胞内コンパートメントへ送達するので、リボソーム内およびリボソーム上で発現させたペプチドを供給することで、恐らくは細胞内送達が可能となろう。

リボソームの構造および特性の同定からは、標的とする薬剤送達を果たすための伝達体としての小胞のための多くの提案用途が導き出されているが、そのほとんどが多数ある種々の理由の何れかのために実現できていない。最も顕著には、従来のリボソームの治療上の傾向用途は、単核食細胞による網内細胞系への急速な取り込みのために、制限されるべきことが判明した[GregoriadisおよびRyan, Eur. J. Biochem. 27:485-491(1972); BeaunierおよびHwang, Biochem. Biophys. Acta 731:23-30(1983)]。この特定細胞種による取り込みは、標的細胞または組織自身が網内細胞系の一部であるという限定された条件下では有利であるが、一般に食細胞による取り込みは送達されるべき化合物の分解を招き、それにより化合物を他の

細胞または組織種へ送達することに対して重大な障害が起こる。

リボソーム薬剤送達に対して内在する問題を打開する試みにおいて、研究は、網内細胞系によるリボソームの取り込みに続き、血中への再放出されると考えられる化合物の同定、リボソームの静脈内投与に対する代替法、および血流中でのリボソームの安定性を増すための種々の化合物、例えばコレステロールの使用を始めとするいくつかの試みに向けられた[Kirbyら, Biochem. J. 186:591-598(1980); Hwang, リボソームの生物物理学から治療学まで, Ostro (編) Marcel Dekker, New York (1987) 109-156頁; Beaumierら, Res. Comm. Chem. Pathol. Pharmacol. 39:227-232(1983)]。さらにその他の研究では、赤血球細胞の自然に生じる二重層をより近いように模擬したリボソーム二重層を形成するため、種々の脂質組成物を検討した。かかる努力は循環中でのリボソームの半減期の増加をもたらした[AllenおよびChonn, FEBS Lett. 223:42-46(1987); GabizonおよびPapahadjopoulos, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 85:6949-6953(1988)]。

PCT公開WO95/27496およびGaoら, Life Science 54:247-252(1994)は、水溶液

(9)

特開2001-521488

中での送達と比較したVIPの送達用のリボソームの使用について記載している。リボソーム中へのVIPを封入することは、蛋白質分解変性からペプチドを防護し、かつVIPの能力を顕著に助長し、また高血圧ハムスターで水溶液中のVIPに比べ、平均動脈血圧を減少させることが判明した。リボソームに会合させたVIPは、初期投与後大抵5分で最低血圧を認識し、およそ12分間平均動脈血圧を著しく低下させることが判明した。また、該公開は水溶液中でのVIPのリボソームへの結合、およびリボソーム二重層へのペプチドの貫通を証明した。リボソームへのVIPの結合は、リボソーム膜へのペプチドの分配、蛋白質分解に対するペプチドの安定化、もしくはは生物学的

に活性なコンホメーション内にペプチドを制限することの何れかによって、ペプチド活性の低下を防護する可能性があることが推測された。何れの理由であれ、リボソーム中へのVIPの封入は、高血圧ハムスターの血圧低下における効果を延長すること、およびその効果の大きさを増大することの双方により、ペプチドのin vivo生物学的活性を助長した。にもかかわらず、当該技術分野では、VIPのごとき生物学的に活性なペプチドの治療上および診断上の送達におけるさらなる改良法の提供が依然として望まれる。

本発明では、蛋白質の水溶性ポリマーへの結合を通じて循環する蛋白質の半減期の増大を観察することに注目する[Nucciら, Adv. Drug Del. Rev. 6:133-151(1991); Woodleyら, Proc. Inter. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 17:77-78(1990)]。このような観察は、循環からのリボソームの急速な溶化の発生を顕著に最小化した改良薬剤送達系としての、立体的に安定化させたリボソーム(SSL) (「PEG-リボソーム」としても知られる)の開発につながった[LasicおよびMartin, Stealth Liposomes, CRC Press, Inc., Boca Raton, FL(1995)]。SSLは、そのポリマー、好ましくはポリエチレングリコール(PEG)がリン脂質の一つに供給結合されているポリマー被覆リボソームであり、その小胞二重層の外側に親水性クラウド (cloud) を提供する。この立体的障壁はオプソニンによる認識を遅らせ、SSLを従来のリボソームより随分長く循環中に留まらせ[LasicおよびMartin, Stealth Liposomes, CRC Press, Inc., Boca Raton, FL(1995); Woodleyら, Bio

(10)

特許2001-521486

chem. Biophys. Acta 1190:99-107(1994);Bedu Addoら, Pharm. Res. 13:718-724(1996)」、いくつかの化学療法薬および抗感染薬に関して証明されているごとくに、封入試薬の薬理学的効力を増強する[LasicおよびMartin, Stealth Liposomes, CRC Press, Inc., Boca Raton, FL(1995)]。この領域にお

ける研究は、異なる要因が循環半減期に影響を及ぼし、理想的には5%の濃度でおよそ2,000Daの分子量のPEGを伴う平均小粒径が200nmを下回るべきことを示した(9-12)[LasicおよびMartin, Stealth Liposomes, CRC Press, Inc., Boca Raton, FL(1995);Woodleら, Biochem. Biophys. Acta 1105:193-200(1992);Litzingerら, Biochem. Biophys. Acta 1190:97-107(1994);Bedu Addoら, Pharm. Res. 13:718-724(1996)]。しかしながら、望ましい特性を有するSSL製剤で会合化合物の活性が消失する可能性がある場合、これらの生理学的特性を有し、かつ生物活性化化合物を含むSSLの調製は合併症なしには存在しない。これは特に粒子サイズ分布の狭い小サイズのリボソームを得るのに発現プロセスが用いられる場合である。完全には理解されていない理由のために、かかる押し出し法は該リボソームと会合した生物学的活性ペプチド化合物を実質的に低下させる。従って、立体的に安定であるが会合ペプチド試薬の生物学的活性を維持する改良リボソーム組成物が依然として所望される。

また本発明では、音波（超音波）による器官イメージングの画質向上に有用な多重ラメラリボソームに関するPCT公開W093/20802の開示に注目する。該公開は、抗体、抗体断片、または組織特異的標的を高めるために脂質二重層に組み込まれた薬剤のごとき組織特異的リガンドを始めとする0.8ないし10ミクロンの範囲サイズの種々のリボソーム組成物について記載している。該オリゴラメラリボソームは、凍結乾燥、凍結-解凍の反復、または本質的に分離した二重層を製造する改良二重乳濁法により製造される。好ましいリボソームは直径1.0ないし3.0ミクロンの範囲であると言われている。かくして、約0.5ミクロンのサイズ未満の従来の超音波技術により容易に検出できるリボソームを製造することはなお一層困難であった。従って、効率的に製造される可能性があり、かつ約0.5ミクロン未満の平

(11)

特許2001-521436

均粒子サイズを有する改良リボソーム組成物が依然として所望される。さらに、効率的に製造され、*in vivo*で安定であり、かつ音波イメージングにおいてより高度な解決法を提供する改良リボソーム組成物が依然として所望される。

かくして、当該技術分野において、生物活性分子の治療および診断的投与のためのリボソーム技術の使用におけるさらなる改良法を提供する必要性が存在する。さらに特に、当該技術分野において、さらに延長された有効な医薬効果を達成するために、限定されるものではないが、VIP/GRFペプチドファミリーのメンバーを含む両親媒性ペプチドの投与のための改良法が依然として所望される。

発明の概要

本発明は、リボソームと会合させた生物学的に活性な両親媒性化合物を含有する生物学的に活性なリボソーム製品の改良製法に関する。本発明の該リボソーム処方では、会合ペプチドの生物学的効果の効力および持続時間における改良をもたらす様式で、該生物学的に活性なペプチドの生物活性を送達、増強する。該生物学的効果の効力および持続時間の増大は、少なくとも部分的には該化合物が達成する様式で該化合物とリボソームとの相互作用の結果であると確信されており、活性のある、あるいは水性環境中の化合物より活性のあるコンホメーションに維持される。かくして本発明は、限定されるものではないが、網内細胞系による取り込み、化合物の分解、または不活性コンホメーションにある化合物の送達のごとき従来のリボソーム処方に伴う問題を打開する。

本発明の一つの態様によれば、a) 水性性ポリマーと共有結合させた少なくとも1種の脂質組成物を含む脂質の組み合わせを混合し、b) 該脂質の組み合わせから立体的に安定化させたリボソームを形成し、c) 約300nm未満の平均直径を有するリボソームを得、次いで

d) 工程c) からのリボソームを、活性コンホメーションにある工程c) からの該リボソーム会合させるようにする条件下で、生物学的に活性な両親媒性化合物と共にインキュベートすることを特徴とする、リボソームと会合状態にある生物学的に活性な両親媒性化合物を含有する生物学的に活性なリボソーム製品の製法を提供する。本発明のもう一つの態様によれば、該生物学的に活性なリボソーム

(12)

特許2601-521486

製品は一般に治療用途に好ましい単一ラメラリポソームから構成される。本発明の別の態様によれば、生物学的に活性なりポソーム製品は、多重小胞リポソームから構成され、好ましくは、該生物学的に活性な化合物と共に、工程c)で得られたリポソームを逐次脱水および再水和する工程を行うことにより、多重小胞リポソームを形成するさらなる工程を特徴とする方法によって製造される。それと反対に許容される何れの意味にも拘わらず、多重小胞リポソーム、多重ラメラリポソームおよびオリゴラメラリポソームは、「タマネギ様」配置ではないが、図1で示されたごとき多重かつ不規則な内部「コンパートメント」を含有するリポソームと解釈される。該多重小胞リポソームは、本発明の治療用途に用いられてよいが、特に、それらが驚くべきエコー発生特性を示す本発明のエコー発生診断法に有用である。

本発明の一つの態様のごとくに、該リポソームは水溶性ポリマーに共有結合させた少なくとも1種の脂質成分を含む脂質の組み合わせから製造される立体的に安定化させたりポソーム(SSL)である。この水溶性ポリマーは、好ましくはポリエチレングリコール(PEG)であり、細胞内細胞系の構成要素による取り込みに対して、得られたリポソームを立体的に安定化させる働きをする。

本発明の方法は何れの生物学的に活性な両親媒性化合物を用いても有用であり、それにより該リポソーム脂質二重層と会合状態にある

る、または該リポソーム脂質二重層内での会合状態にある活性コンホメーションに安定して維持することができる。好ましい両親媒性化合物としては、それらの生物学的に活性なコンホメーション内に1以上の α または α らせんドメインを有することにより特徴付けられたもの、特に極性残基および無極性残基がらせんの反対側に分離しているものが含まれる。本発明に有用な特に好ましい両親媒性化合物としては、生物学的に活性なその類似体を含む、バソアクティブ・インテスティナル・ペプチド(VIP)/成長ホルモン放出因子(GRF)ペプチドファミリー何れのメンバーも含まれる。哺乳類および非哺乳類VIP/GRFポリペプチドファミリーとしては、VIPおよびGRFの機能的類似体、ペプチドヒスチジンイソロイシン(PHL)、ペプチドヒスチジンメチオニン(PHM)、成長ホルモン放出因子(GRF)、下垂

(13)

特表2001-521488

体アデニル酸シクラーゼ活性化ペプチド(PACAP)、セクレチンおよびグルカゴンが挙げられる。VIPと同様、VIP/QRFペプチドファミリーの他のメンバーおよび生物学的に活性なその類似体は、そのペプチドの疎水性ドメインおよび親水性ドメインが分離し、かつその疎水性ドメインが脂質二重層に結合することができる両親媒性らせんを形成することができる。また本発明は、本発明の方法によって製造されたリボソームと会合状態にある増強された生物活性を有する受容体アンタゴニストを意図する。本発明の用途のための特に好ましいペプチドはVIPである。本発明の生物学的に活性なペプチド製品は、高レベルの生物学的に活性化化合物を送達すること、または下記に記載されるごとくにリボソーム製品の標的化した送達を検出することが所望される多様な治療用途および診断用途に利用される可能性がある。

さらに本発明は、それらが平均径で1000nmよりも小さい、また300nmよりも小さくさえあるという事実に関わらず、驚くべき音波反射

特性を有する改良音波診断製品を提供する。直径が300nm未満のリボソームを用いる結果は、リボソームが直径0.8ないし3.0ミクロンの範囲である当該技術分野の技術に照らして特に驚くべきものである。特に、本発明は、約1000nm未満の、特に音波反射技術を用いる改良イメージングのためには約500nm平均直径を有する多重ラメラ診断用リボソームの製造法および使用法を提供する。本明細書で、音波反射、エコー反射、超音波イメージングが本質的に同じ意味を有して用いられる。本発明の方法は、少なくとも1種の脂質成分を水溶性ポリマーに結合させた脂質の組み合わせを混合し、その混合した組み合わせ脂質からリボソームを形成して得、生物学的に活性な両親媒性化合物と共にインキュベートし、次いで約1000nm未満の平均直径を有する多重ラメラリボソームを形成する工程を特徴とする。本発明の好ましい具体例によれば、該多重ラメラリボソームは凍結乾燥法を実施することにより形成される。好ましい具体例では、まず該脂質混合物から形成されたリボソームは約300nm未満の平均直径を有し、もう一つの具体例ではこれらのリボソームは押し出し成形によって得られる。本発明の好ましい多重ラメラリボソームは約800nm未満の平均直径を有するが、最も好ましくは約300nm未満

(14)

特許2001-521486

の平均直径を有する。好ましい具体例では、該水溶性ポリマーはPEGである。本発明の生物学的に活性な化合物には、 α または π らせんドメインを形成することができる、好ましくはVIP/GRFペプチドファミリーのメンバーから選択されるものが含まれる。本発明の最も好ましい生物学的に活性な化合物はVIPである。これらの発明の何れの理論により拘束されるつもりもないが、PEGのごとき水溶性ポリマーを多重ラメラリポソーム組み込むことで、比較的小サイズであるにも拘わらず、音波エネルギーを反射する能力のより高いそれらを製造することができると思われる。なぜそうなるのか完全には理解さ

れていないが、一つの可能性として水溶性ポリマーの存在が、単一の多重小胞リポソームを構築する複数のリポソーム小胞の壁を分離するように作用し、かくして音波放射をよりよく反射することができるリポソームにするということが挙げられる。

さらに本発明は、本発明の診断用リポソームが、生物学的に活性な親水性化合物を診断的に有効な量で標的組織に投与し、次いで該リポソームを音波反射を用いて *in vivo* で検出することを特徴とする、改良音波診断法を提供する。本発明の好ましい標的組織は腫瘍である。一つの具体例では、生物学的に活性な化合物は、少なくとも1以上の α または π らせんドメインを有することにより特徴付けられる。好ましい具体例では、該化合物はVIP/GRFペプチドファミリーのメンバーの何れかであり、最も好ましい具体例では該化合物はVIPである。

図面の説明

図1は、本発明の多重ラメラリポソームの顕微鏡写真である。

図2は、SSL中1.0mmolのVIPのボラス注射による処理後の高血圧ハムスターの平均動脈血圧における低下の持続を示す。

図3は、正常血圧ハムスターでのSSL中0.1mmolの7分間の灌水の小動脈圧における効果を示す。

図4は、高血圧ハムスターの鼻腔へ30分間注入したSSL中1.0mmolの効果を示す。

図5は、ホルミル-L-メチオニル-L-ロイシル-L-フェニルアラニン(fmlp)ペプチド

(15)

特許2001-521486

に対する好中球化学走性の応答におけるSSL中VIP、VIP単独、およびSSL単独の効果について記載する。

図6は、実施例3に記載する方法によって製造されたリボソームを用いる、平均動脈血圧における低下を示す。図中のアステリクスはSSL中VIPとVIPを欠くSSL間の統計学的に有意な差異を示す。

発明の詳細な説明

本発明は、リボソームと会合状態にある生物学的に活性化両親水性化合物を含有する生物学的に活性化リボソーム製品の製法を提供する。好ましい両親水性化合物は、その疎水性ドメインがリボソーム二重層と会合することができる、またはリボソーム二重層内で会合することができる程度まで分離した親水性ドメインおよび疎水性ドメインを有することにより特徴付けられる。本発明化合物は、該リボソーム二重層と会合状態にある、または該リボソーム二重層内で会合状態にある生物学的に活性化コンホメーションを獲得していることが好ましい。活性コンホメーションは、所望の化合物が、例えば、受容体またはリガンド認識および結合を通じてその正常な生物学的活性に最も影響を及ぼしやすいものである。本発明の化合物は、疎水性ドメインおよび親水性ドメインに分離している、1以上の別個の α または β らせんドメインを有することにより特徴付けられると考えられる。本発明の好ましい化合物はVIP/GNFマブチドファミリーのメンバーである。本発明の最も好ましい化合物はVIPである。生物学的に活性化化合物はリボソーム二重層と会合しているが、その会合は不可逆的であり、該化合物はリボソームおよび化合物の特性により、リボソームとの会合から直ちに、または時間を経て放出され得る。

しばしば所望サイズのリボソームを得るための膜およびフィルターを通して、ペプチド含有リボソームを押し出し成形する工程を含む先行技術に比べ、本発明のリボソームは活性化化合物成分との接触に先立ち300nm未満の直径を有するものが得られる。このサイズのリボソームはリボソームを改良し、それにより生物学的に活性化化合物と共にインキュベートするに先立ち、好ましい平均径までリボソームのサイズを減じる押し出し成形工程を用いて得ることができる。

(16)

特表2001-521486

別法として、濾過または他のサイズ選択技術のごとき技術を用いて所望サイズのリポソームを選択してもよい。本発明のサイズ選択リポソームは約300nm未満の平均径を有するはずであるが、それらは約200nm未満の平均径を有するよう選択されることが好ましく、約100nm未満の平均径を有することが特に好ましい。該生物学的に活性なりポソーム製品が一重ラメラリポソームである場合、約200nm未満の平均径を有するよう選択されることが好ましい。本発明の最も好ましい一重ラメラリポソームは、約100nm未満の平均径を有する。しかしながら、一般により小さい一重ラメラリポソームから誘導された本発明の多重ラメラリポソームがより大きく、約1000nmの平均径を持ち得ると理解されている。本発明の好ましいリポソームは、約800nm未満、および約500nm未満の平均径を有し、一方、本発明の最も好ましい多重小胞リポソームは約300nm未満の平均径を有する。

本発明のリポソームは、十分に公知であり、当該技術分野で通常に利用される、水溶性ポリマーに共有結合させた少なくとも1種の脂質成分を含む脂質材料の組み合わせから製造されてよい。脂質としては、スフィンゴミエリンのごとき比較的に堅い種、または不飽和アシル鎖を有するリン脂質のごとき液体種が挙げられる。本発明のポリマーはSSL技術、および例えば、ポリビニルアルコール、ポリラクチン酸、ポリグリコール酸、ポリビニルピロリドン、ポリアクリルアミン、ポリグリセロール、ポリアキソズリン類またはポリマーヘッド基を有する合成脂質を始めたとする蛋白質の循環半減期を増大するものに有用な技術に関する当該技術分野で公知であり、通常に利用されている何れの化合物を含んでもよい。本発明の最も好ましいポリマーは、1000ないし5000の間の分子量を有するPEGである。本発明によってリポソームを製造するための好ましい脂質としては、PEG(PEG-DS PE)ホスファチジルコリン(PC)、およびホスファチジルグ

リセロール(PG)に共有結合させ、さらにコレステロール(Chol)を併用するジステロイル-ホスファチジルエタノールアミンが挙げられる。本発明の好ましい具体例によれば、本発明のリポソームを製造するための脂質とコレステロールの組み合わせは、PEG-DSPE:PC:PG:Cholのモル比が0.5:5:1:3.5で構成される。

本発明の方法によって製造されたりポソームは、安定性および生物学的活性が

(17)

特許2001-521486

改良され、かつ種々の治療に有用であることにより特徴付けられる。一つの具体例によれば、本発明は、その生物学的に活性な両親媒性化合物が抗癌化剤活性、抗加齢、抗しわ形成、または創傷治療能を有する生物学的に活性なリポソーム製品を含有する組成物を包含する。この種の組成物は、化粧品または医薬特性を持ち得る。好ましい化粧品組成物には、生物学的に活性なVIPが含まれる。また本発明は、その製法がさらに腸溶性の被覆中に該生物学的に活性なリポソーム製品を封入する工程を含む、胃腸疾患の治療のための経口制御放出製剤も提供する。該経口制御放出製剤は、炎症性腸疾患、慢性便秘症、ヒルシュスプルング病、弛緩不能症、乳児性肥厚性幽門狭窄症および潰瘍よりなる群から選択されるものを含む種々の胃腸疾患に有用である。その好ましい経口製剤には生物学的に活性なVIPが含まれる。また、生物学的に活性なVIPを含有するリポソーム製剤は、嘔息、全身性高血圧症および肺高血圧症、硬皮症、心筋虚血、不能症および禿頭のごとき症状のための有望な治療薬でもある。さらに本発明は、VIPを含有するリポソーム組成物中でその器官をインキュベートする工程を含む、受容者内に貯蔵および移植のための身体器官、組織または細胞種を保存する方法を提供する。

さらに本発明は、本発明の方法によってリポソームと会合状態にある生物学的に活性な両親媒性化合物を含有する生物学的に活性な

リポソーム製品を製造し、次いで治療上有効量の該リポソーム製品を標的組織に投与する工程を特徴とする、生物学的に活性な両親媒性化合物を標的組織に投与する方法を提供する。本発明のリポソーム製品は、静脈内、動脈内、またはエロゾル投与、噴霧、吸入、もしくは通気によるごとき鼻腔内、気管内、関節内、経口、経皮、皮下、限定されるものではないが、口腔粘膜、胃腸下部粘膜および結膜のごとき粘膜への局所投与、並びに標的への直接投与により投与すればよい。

治療法において生物学的に活性化化合物類は、特にその化合物が循環中、特に短い半減期を有するか、生物学的活性が低下する場合は、単独化合物の投与に比べ、顯著に減じた投与量レベルで投与することができる。例えば、SSLと会合状

(18)

特表2001-521486

態にあるVIPでは、VIP単独投与に比べ生物学的活性の増強、延長を示すことが期待できる。一般に、SSL中の生物学的に有効量のVIPは、水溶液中でのVIPの生物学的有効量より約50ないし75重量%低い。生物学的活性化合物がSSLと会合しているにもかかわらず、従来法により投与される化合物によって与えられる同等の結果を達成するのに必要な生物学的有効量を決定するため、該リボソーム製品を試験しなければならない。通常、当業者には、従来法により送達する場合、ある化合物の生物学的有効量がSSL中の化合物の有効量の決定における開始点として役に立つことが判るであろう。従って、所望の生物学的効果を達成するのに必要な最小投与量を決定するため、SSL中の同等およびそれより低い投与量が、単に慣例であるにばかりでなく、十分効果的であろうことが強く推測されよう。VIP投与の場合、例えば、従来の投与が20mgの投与量を要するとすれば、同等の効果を達成するためのSSL中のVIPは恐らく5ないし10mgであろう。典型的には、静脈投与されるVIPの生物学的有効量は、カプセル形態で一日につき総量0.01ないし50mg

または0.1ないし500mgVIPであろう。

本発明の生物学的に活性な化合物のSSLとの会合では、該化合物単独の投与に続いて観察される効果の約50%ないし100%上回って、該化合物の生物学的効果の大きさが増大することが期待される。同様に、本発明のSSLとの会合では、生物学的効果をより長く持続させることが期待される。

さらに本発明は、多重小胞性生物学的活性リボソーム製品を含有する改良された診断用組成物、および本発明の方法によって製造した多重ラメラリボソームと会合状態にある生物学的に活性な両親媒性化合物を含有する生物学的に活性なりボソーム製品を製造し、診断上有効量の該リボソーム製品を標的細胞に投与し、次いで該標的細胞におけるリボソームの取り込みまたは相互作用を検出する工程を特徴とするそれらの使用法を提供する。本発明の一つの態様によれば、該標的細胞は腫瘍である。本法の一つの態様では、該リボソーム製品は、放射性標識、蛍光標識、非蛍光標識、染料、または磁気共鳴イメージング(MRI)を向上させる化合物を含む群より選択される標識で検出可能なように標識される。本発明の好

(19)

特許2001-521486

ましい具体例によれば、該リボソーム製品は音波反射によって検出される。音波イメージングによる検出のための診断用リボソーム製品は、一般には約100nm未満の平均径を有するが、好ましくは、該診断用リボソーム製品は600nm未満の平均径を有し、最も好ましくは約300nm未満の平均径を有する。

また、本発明は、炎症、高血圧症、アレルギー、アルツハイマー病、アテローム性動脈硬化症、炎症性内臓疾患、慢性便秘症、ヒルシュスプルング病、弛緩不能症、乳児性肥厚性幽門狭窄症および潰瘍の治療、細胞増殖の促進または抑制、アポトーシスの阻害、身体器官または組織の創傷治療の促進、器官または組織拒絶反応の阻害

のための本発明の方法によって製造され、生物学的に活性な両親水性化合物を含有する生物学的に活性なリボソーム製品の使用を提供する。

その開示が本明細書の一部とみなされる仮出願第60/014,363号には、本発明によるVIP会合リボソームの使用の結果が記載されている。特に、VIP-PEG-リボソームは下記のごとくに製造された。丸底フラスコを用い、PEGに結合させたDSPE (分子量1,900)、PG、PCおよびコレステロール (モル比0.5:1:5:3.5) を、クロロホルムに溶解させた。該溶液を回転エバポレーター中で一夜乾燥させ、得られた膜を一夜乾燥させた。該脂質膜を、pH6-7の生理食塩水を用いて攪拌しながら再水和し、次いで少なくとも5分間、音波破砕した。かくして形成されたりボソーム製剤は、準弾性光散乱により測定されるPEG-リボソームの平均サイズが80-100nmになるまで、孔径がそれぞれ200nm、100nm、および50nmの積み重ねたNucleoporeフィルターを通して押し出した。ポリプロピレンチューブ中で、VIPおよび寒冷保護剤であるトレハロースを押し出されたりボソーム製剤に加え、該混合物をエタノールまたはアセトン-ドライアイス浴中で少なくとも20分間急速冷凍し、次いで同様の条件下で一夜凍結乾燥させた。バイオゲルA-5mカラムクロマトグラフィーを用いて、遊離VIPをVIP-PEG-リボソームから分離した。元の溶液中のPEG-リボソームおよびVIP-PEG-リボソームのサイズは、準弾性光散乱により測定した。元の溶液中のPEG-リボソームおよびVIP-PEG-リボソームの脂質濃度は、無機リン測定法により測定した。VIP-PEG-リボソーム中のVIP濃度は、ELISA

(20)

特表2001-521486

定量法により測定した。

VIP-PEG-リポソーム中のVIP濃度を測定するため、定量前に会合しているVIPを遊離させる目的で、界面活性剤である1%ドデシル硫酸ナトリウムをVIP-PEG-リポソーム製剤の一部に加えた。PEG-リポ

ソームおよび1%ドデシル硫酸ナトリウム単独は、ELISA定量法を妨害しなかった。これらの製剤を用いた予備試験の制限されない実施例から、後記のごとき腫瘍組織の血管組織に対する生物学的効力の増大および延長が示された。

さらに該低出願は、1.0mmolのVIP-PEG-リポソーム化合物のボラス静注は、自然発症高血圧ハムスターの平均動脈血圧(MAP)を低下させた。この結果は、本明細書において図2Aおよび2Bに示されている：図2Aは、実際の動脈血圧の低下を示し、図2Bは、%変化を示している。データは、平均値±標準偏差である：アスタリスクは、危険率5%以下で対照と比較した場合の、統計学的に有意な値を示している。結果は有意な漸次的および持続的な平均動脈血圧の減少を示し、VIP-PEG-リポソーム注入後2時間以内に最低点に達し、7時間の観察期間中それが持続した。

もう一つの実験によると、正常血圧ハムスターの頸袋を0.1mmolのVIP-PEG-リポソーム組成物で7分間灌流したところ、*in situ*において平均動脈径の有意な増加を起こした。この実験の結果は図3にデータで示され、結果の有意性は前記図2Aおよび2Bに示されている。小動脈径の基底値からの有意な増加が認められ、最大効果は灌流開始5分以内に認められた。動脈径は、灌流停止9分後に基底値に戻った。

さらにもう一つの実験において、高血圧ハムスターの外鼻孔に1.0mmolのVIP-PEG-リポソーム組成物を30分間注入したところ、動脈血圧の低下が起こり、それは少なくとも150分間持続した。これらの結果は図4に示されている。漸次的および持続的な、平均動脈血圧の正常範囲への低下が認められ、それは2.5時間にわたる観察期間中持続した。

最後に、もう一つの実験として好中球化学走性に対するVIP-PEG-

(21)

特表2001-521486

リボソームの影響を、*in vitro*における化学走行分析に通常用いられる2槽式装置を用いて検討した。実験の結果は図5に示されている。下槽のホルミルメチオニル-ロイシルフェニルアラニル (fmIp) ペプチドに反応した上槽から下槽への好中球の移動を最初の基底対照値としてした。下槽の媒体 (ハントの平衡塩溶液、HBSS) およびVIP単独に対する好中球移動はほとんどなく、下槽のVIP-PEG-リボソームおよびPEG-リボソームに対してはごく僅かの好中球移動が認められた。好中球とVIPを共に上槽に加えた場合、下槽のfmIpに対して有意な移動が認められたが、好中球とPEG-リボソームを共に上槽に加えた場合に比して僅かに低いレベルの細胞移動であった。最後に、VIP-PEG-リボソームを細胞と共に上槽に加えた場合、fmIpに対する好中球移動がほとんど無視できるレベルにまで減少した。これらの結果は、VIP-PEG-リボソームはfmIp反応性好中球移動の化学走行を阻害できることを示している。

本発明は以下の実施例によりさらに明らかにされる。実施例1は、自然発症高血圧ハムスターに投与した場合、生物学的に活性なVIPペプチドのリボソームへの取り込みが、ペプチド活性の期間と規模を増大させることを説明する当該技術の状態を記載する比較実施例である。実施例2は、本発明の方法により、立体的に安定化させたリボソーム(SSL)と会合状態にある、同等の生物学的に活性なペプチドの実験に関するものであり、該リボソームはペプチド活性においていっそう劇的な増加をもたらす。実施例3では、異なる調整技術が非常に異なるレベルのペプチド活性を生じさせることが示される本発明により、SSLの調整のための別法を提供する。実施例4では、実施例3で記載した方法により製造されたリボソームの形態学的特徴の分析法を提供する。実施例5は、製造工程の単純化が*in vivo*におけるペプチドの活性に全く影響しないという、生物学的活性を有す

るペプチドを有するSSLを製造する変法に関するものである。実施例6は、リボソームのエコー反射特性に基づく音波反射イメージングにおける使用のための製品および診断用リボソーム製品の使用について記載している。

実施例1

従来のリボソームにおけるペプチドの生物学的活性 (比較実施例)

本実施例により、本発明の方法との比較のための基礎を提供する目的で、VIPのリポソームへの取り込みのための先行技術の方法が再現された。従前の研究において、VIPが血管運動の緊張を制御する上で、ある役割を担っていることが示唆されたため、*in situ*末梢細循環において、ペプチドを溶解し送達するために使用される伝達体の機能としてのVIP活性を最初に検討することとした。さらに特に、VIPの局所投与により自然発症高血圧ハムスターの末梢細循環における血管拡張が惹起されるかどうか、および従来の一重ラメラリポソームへVIPが封入されることにより、認められた反応の何れかを調節することができるかどうかを測定するため、最初の実験が行われた。

成熟した雄の自然発症高血圧ハムスター ($n=21$) および年齢と遺伝学的要因が適合した正常血圧対照群 ($n=20$) を、Canadian Hybrid Farms, Halls Harbor, NS, Canadaから購入した。準備として、ペントバルビタールナトリウム (6mg/100g体重) を腹腔内投与して動物に麻酔をかけ、自発的呼吸を容易にするために気管開口術を施した。麻酔 (2ないし4mg/100g体重/時間) に逐次注入のために、左大腿静脈にカニューレーションした。全身動脈血圧および心拍数を記録するためカテーテルを左大腿動脈に挿入した。体温は、加熱パッドを用い実験期間中を適して常に37ないし38℃を維持するよう監視した。

頸袋の細循環を視覚化するため、従前に記載された方法が用いられた [Gaoら, *Life Sci*, 64:PL274-PL252(1994);MayhanおよびJoyner, *Microvasc. Res*, 28:159-179(1984);MayhanおよびRubinstein, *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 184:1372-1377(1992);Raud, *Acan Physiol, Scand. Suppl*, 578:1-58(1989);RubinsteinおよびMayhan, *J. Lab. Clin. Med*, 125:313-318(1995);Rubinsteinら, *Am. J. Physiol*, 261(Heart Circ. Physiol, 30):111913-111918(1991);およびSuzukiら, *Life Sci*, 57:1451-1457(1995)]。便宜には、左頸袋を小さなプラスチックのベースプレート上に広げ、頸袋脈を露出させるために外側の皮膚を切開した。無血管の結合組織層を除去し、プラスチックの箱をベースプレート上に置き、皮膚を上槽の周りに縫合することにより固定した。この準備により、三層からなる複合体が形成される：ベースプレート、上槽および二つのプレートの間で露

出されている類袋膜。上槽は、暖めた二炭酸塩緩衝液（37-38℃）を入れた貯蔵槽に接続され、連続的な類袋の灌水が可能である。緩衝液は、連続的に95%酸素、5%二酸化炭素(pH7.4)で通気した。槽はまた、三方弁を通して持続注入ポンプ(Sage Instruments, Cambridge, MA)に接続され、制御された薬物投与が可能である。この動物準備方法は、以下に示すごとく、後の研究においても同様に利用できる。

VIPを含有するリポソームは、Gaoら, *Life Sci.* 64:PL274-PL252(1994);GregoriadisおよびFlorence, *Drugs* 45:15-28(1993);MacDonaldら, *Biochim. Biophys. Acta* 1061:297-303(1991);およびSuzukiら, *Life Sci.* 57:1451-1457(1995)の方法によって調製した。便宜には、卵黄ホスファチジルコリン(Sigma, St. Louis, MO)、卵黄ホスファチジルグリセロール(Sigma)およびコレステロール(Sigma)が4:1:5のモル比から成る脂質組成物(総脂質含量5mg)をク

ロロホルム(Sigma)中で混合し、溶液を蒸発させて乾燥させた。乾燥させた脂質膜は、ポルテックス混合器および音波破砕を用いて、0.7mgのVIPを含有する100 μ lの0.15モル塩化ナトリウム溶液に再懸濁した。ドライアイス-エタノール浴を用いて懸濁液を5サイクルの凍結-溶解にかけ、LiposoFast装置(シンジ容積0.5ml;Avestin, Ottawa, ON, Canada)を用い、2枚のポリカーボネートフィルム(孔径3 μ m;Nuclepore, Pleasanton, CA)を通して9回押し出した。リポソームはアイスボーザブルのゲル濾過カラム(Econo-pac 100G, ボリアクリルアミドゲル, バッドボリューム10ml)を用い、0.15M塩化ナトリウムで回収した[MacDonaldら, *Biochim. Biophys. Acta* 1061:297-303(1991)];リポソーム分画は空疎容量中にて回収し、使用まで4℃で保存した。

以下のように、動脈径の変化が測定された。頸動脈における微小循環が、光ファイバ光源を用いて上方照射され、ニコン(Nikon)の顕微鏡によって観察された。顕微鏡によって、低照度テレビジョンカメラと、テレビジョンモニタと、ビデオテープレコーダ(日本、横浜、パナソニック)とを備える閉回路テレビジョンシステム内に画像が投影された。頸動脈における二次細動脈の内面径は、ビデオマイクロメータ(VIA-100、バックラー・インスツルメント(Boeckele

(24)

特表2001-521486

r Instruments、タクソン、アリゾナ)を用いて、顕微鏡画像のビデオ表示から測定された。ビデオシステムの倍率の校正は、微細血管径をマイクロメートルで得るために、顕微鏡ステージマイクロメータを用いて行われた。モニタスクリーン上での明瞭な観察と、頰囊における細動脈分岐パターン内の位置のために容器を選択した。各動物において、実験中に同じ細動脈部分を用いて、内腔開口径の変化を測定した。ある研究においては、以前の介入から細動脈径の測定がベースラインに一旦戻ると、2つ以上の処理グ

ループに動物を用いた。

VIPが単独に、またはリボゾームで被覆した状態で、0.05モルまたは0.1モルペプチドのVIP濃度で7分間、後充溢され、ペプチドを応用するまでに30分以上経過した。VIPの局所応用の前、その最中およびその後の細動脈径の変化が、上記のように決定された。これらの実験に使用するVIPの濃度は、以前の研究に基づくものであった[Gao(高)他、Life Sci. 64:PL274-PL252(1994); Suzuki(能)他、Life Sci. 57:1451-1457(1995)]。

両濃度でのVIP単独の充溢が正常血圧のハムスターの有効血管拡張に関連し、充溢の開始から4分以内に最大応答が観測されたことを結果は示した。VIPの充溢が停止した後、1分以内に細動脈径がベースラインに戻った。対照的には、VIP単独の充溢は、自然高血圧のハムスターの細動脈径に効果を表さなかった。高血圧動物でのVIPに対するこの鈍い応答は、内皮に対する非特定の損害に帰するものではなかった。その理由は、ニトログリセリン、頰囊における内皮独立血管拡張剤[メイバン(Mayban)およびルビンスタイン(Rubinstein)名、Biochem. Biophys. Res. Commun. 184:1372-1377(1992); ルビンスタイン(Rubinstein)他、Am.J. Physiol. 261(Heart Circ. Physiol. 30):111913-111918(1991)]が両集団において同様の血圧降下を起こすからである。

同一量であるが、リボゾームに被覆されたVIPの充溢では、VIP単独と比較して、正圧性動物が、有効濃度依存増強作用および血圧降下効果の延長を示した。最大応答は、充溢開始後3分から4分で検知され、充溢が停止した後、有効血管拡張がおよそ9分間持続した。自然高血圧のハムスターでは、リボゾーム被覆され

(25)

特許2001-521486

たVIPが、正圧性動物で観察されたものと同様の有効血圧降下効果を取めた。最大効果は、充溢開始後4分以内に検知され、充溢が停止した後、有効血

圧降下が3分以上持続した。VIPのリボゾーム被覆によって自然高血圧のハムスターのペプチドの血圧降下効果を、正圧性動物で観察されるものと同様に回復できるとしても、効果の持続期間はずっと短かった。

これらの結果により、正圧性ハムスターの周辺微小循環でのVIPによって現れる血管拡張は、2つの要素、すなわち、第1に応答の大きさの調節、第2にその持続期間の調節から成る。前者は、水性および脂質環境で表されるが、後者は、VIPが脂質二重層に分割された時のみ観察され[ガオ (Gao) 他、Life Sci, 64:PL 274-PL252(1994); グレゴリアディス (Gregoriadis) およびフロレンス (Florence)、Drugs 45:15-28(1993); マクドナルド (MacDonald) 他、Biochim. Biophys. Acta 1061:297-303(1991); ムッソー (Musso) 他、Biochemistry 27:8174-8181(1998); ノダ (Noda) 他、Biochim. Biophys. Acta 1191:324-330(1994); ロビンソン (Robinson) 他、Biopolymers 21:1217-1228(1982); ソロビエフ (Soloviev) 他、J.Hypertens. 11:623-627(1993); スズキ (Suzuki) 他、Life Sci, 57:1451-1457(1995)]、これはVIP分子における α 螺旋形成に適する環境を提供することも可能である[ノダ (Noda) 他、Biochim. Biophys. Acta 1191:324-330(1994); ロビンソン (Robinson) 他、Biopolymers 21:1217-1228(1982)]。完全には明らかでない理由のため、周辺微小循環におけるVIP誘発血管拡張の脂質依存成分は、特発性高血圧のハムスターには見られないことが分かった。

実施例 2

立体的に安定したリボゾームにおける対生物作用の特徴

従来のリボゾームにおけるVIP被覆がペプチドの容量を回復して、自然高血圧のハムスターの血管拡張を誘発したことを説明したが、本発明の立体的に安定したリボゾームに関連する細のVIP活性の変化

を試験した。

(26)

特表2001-521486

本質的には実施例1で述べたように、以下の変化に伴って、正圧性動物を準備した。ゴールデンハムスターの大人の雄 ($n=28$; 体重 $120-140\text{ g}$) に、ペントバルビツールナトリウムで麻酔をかけ ($6\text{ mg/体重 } 100\text{ g}$, *i. p.*)、大腸静脈にカニューレを挿入して、脈管内トレーサと、フルオレセインイソチオシアン酸塩標識のデキストラン (FITC-デキストランを 1.0 ml の塩水に溶解; 分子質量 70 kDa ; $40\text{ mg/体重 } 100\text{ g}$ 、1分以上投与) と、追加麻酔 ($2-4\text{ mg/体重 } 100\text{ g/時間}$) とを投与した。循環の微小循環における変化を目に見えるようにするために、上記実施例1で述べた手順を採用した。

立体的に安定したリポゾーム (SL) を以下のようにして準備した。卵黄ホスファチジルコリン (シグマ)、卵黄ホスファチジルグリセロール (シグマ)、コレステロール (シグマ)、およびジステアロイル。ホスファチジルエタノールアミン (モル比 $5:1:3, 5:0, 5$; ホスホリピド含量、 17 mol) に結合されたポリエチレングリコール (分子質量 1900) をクロロホルムで溶解し、混合した【*Gao* 他, *Life Sci.* 64:PL274-PL252(1994); *Lasic* および *Martin*, *Srealth Liposomes*, CRC Press, Inc.; Boca Raton, Florida, 1995. *Suzuki* 他, *Am. J. Physiol.* 271:H282-H287(1996)】。溶液を、回転蒸発器において、 45°C の温度での真空状態で一晚蒸発させた。その結果得られた脂質膜は、 250 ml の塩水で再水和され、渦動され、5分間浴槽超音波処理され、リポゾファースト装置を用いて積み重ねられたポリカーボネートフィルタを介して押し出された (遠心口径: 200 nm , 100 nm , 50 nm ; アベスチン (AVESTIN)・インク、オクワ、オンクリオ、カナダ)。人間のVIP (0.4 mg) およびトレハロー

ス (30 mg)、凍結防止剤を押し出し懸濁液に添加し、その後、アセトンドライアイス浴槽で凍結し、 -46 一定の圧力下において -46°C の温度で一晩親液性化された (フォーシェン (Foreseen) 6、ラプコンコ、カンザスシティ、ミズーリ)。その後、親液性化された「ゲーク」を 250 ml の脱イオン水で懸濁した。SSL関連のVIPは、カラムクロマトグラフィによって遊離VIPから分

(27)

特許2001-521486

隠され (バイオ・ゲル (Bio-Gel) A-5m、バイオ・ラッド・ラボラトリーズ (Bio-Rad Laboratories)、リッチモンド、カリフォルニア)、4℃の温度で最大15日間貯蔵された。SSLの大きさは、準弾性光散乱によって決定されるように 250 ± 50 nmであった (Nicomモデル270サブミクロンパーティクルサイザー、パシフィック・サイエンティフィック (Pacific Scientific)、メンロ・パーク、カリフォルニア) SSL内のリン脂質は、バルレット無機リン酸塩検査によって決定された【ケーツ・エム (Kates, M.)、テクニクス・イン・リポロジー (Techniques in Lipidology)、ワーク・アンド・ワーク (Work and Work) (Bds.)、エルスバイアー (Elsevier) : ニューヨーク、ニューヨーク (1972)、354頁ないし356頁】。SSL内のVIP濃度は、SSLを1%の硫酸ドデシルナトリウムで溶解した後、商業上入手可能な商業上入手可能なELISA検査器具一式によって決定された。回収率は、VIPに対して30%、リン脂質に対して50%であり、リン脂質の0.007VIPモル比を得た。

細動脈径の決定は、上記実施例1で述べたように行った。第1の集団の動物では、SSL内の0.42モルVIPおよび0.85モルVIPが任意の順に1時間充溢された。その後SSL内でVIPを充溢するまで、少なくとも45分間経過した【スズキ (Suzuki) 他、Life Sci, 57:1451-1457(1995); スズキ (Suzuki) 他、Am.J. Physiol. 271:H2

82-H287(1996)】。細動脈径は、充溢直前に、SSL内でVIPを充溢する際に1分毎に5分間隔で測定された。以前の観察により、実験の全期間における塩水単独の充溢が、細動脈径の変化にあまり関係ないことが示された。別の集団の動物では、SSL (0.1モル) 内のVIPまたはSSL (1.8モル/m l リン脂質) 内の0.1モルVIPと同等の濃度の空のSSLを7分間充溢した。

SSL内に0.42モルおよび0.85モルVIPを有する第1の集団の動物を一時間にわたって充溢することによって、細動脈径がかなりの濃度依存延長増加を行った。細動脈径は、SSL内のVIPの充溢が停止した後50分でベースラインレベルに戻った。空のSSLを用いた1時間の充溢は、細動脈径にあまり効果を取めな

(28)

修表200910521486

った。

また、SSL内の0、1モルVIPを用いて第2集団の正圧性動物を充溢することによって、第1集団で観察されたよりも低い程度まで、ベースラインから細動脈径がかなり増加した。細動脈径は、SSL内のVIPの充溢が停止した後13分でベースラインまで戻った。空のSSLの充溢は、細動脈径にあまり効果を取らなかった。一時間の血管拡張が、7分間の充溢に観察されたものよりも大きい場合でも、0、1モルのペプチドを使用することによってベースラインを超えてはるかに変化するという結果が示された。

SSL内のVIPの血管拡張効果が微細血管に対する非特定的損傷によって部分的に生じて、その結果頻数からミクロ分子が流出するかどうかを決定するために[Gao(高)他、Life Sci, 54:PL247-PL252(1994);ラウド(Raudo)、Acta. Physiol, Scand, Suppl, 578:1-58(1989)]、2つの指標を用いて上記のように制御および実験条件の下で、頻数から高分子を一掃することを決定した[Gao(高)他、Life Sci, 54:PL247-PL252(1994);ラウド(Raudo)、Acta, Physiol, Scand, Suppl, 578:1-58(1989)]。第1に、後毛細管の細静脈の周囲の蛍光

「点」または漏泄部位の数の決定であり、第2に頻数からのF I T Cデキストラン一掃の決定であった。

重炭酸塩緩衝液を用いて30分の平衡期間に動物を充溢した後、F I T Cデキストランを静脈内に投与した。SSL (0、1モル) 内のVIPは、その後7分間充溢され、漏泄部位は、最初は7分毎に決定され、その後、60分間に5分間隔で決定された。F I T Cデキストランの一掃は、SSL内のVIPの充溢前、充溢中5分おきに、また60分間の充溢後に決定された[Gao(高)他、Life Sci, 54:PL247-PL252(1994)]。

SSL内のモルVIPの充溢が、目に見える漏泄部位形成に関連しないという結果が示された。同様に、塩水の充溢中のF I T Cデキストランの一掃は、SSL内のVIPの充溢中の一掃と本質的に同一であった。

これらの結果の組み合わせによって、ハムスターの頻数上でのSSL内VIP充溢によって、かなりの延長された濃度依存血管拡張が示された。この応答は、微細血

(29)

特許2001-521486

管内皮に対する非特異的損傷には関連しなかった。なぜなら、SSL内のVIP充溢が一旦停止すると、細動脈径がベースラインに戻り、SSL内のVIPが、顆嚢における後毛細管網静脈からの高分子流出を起こさないからであった。これらの結果により、SSL内のVIPが、高血圧、鬱血性心不全、真性糖尿病および勃起不全等の内皮依存血管拡張を損なう病状において、周辺微小循環における脈管反応性を回復する際に使用可能であったことが示された[ポール(Paul)およびエバディ(Ebadi)、*Neurochem. Int.* 23:197-214(1993);スズキ(Suzuki)他、*Am. J. Physiol.* 271: H282-H287(1996)]。

実施例 3

リボゾーム製法機能としての対生物作用の比較

SSL内のVIPによって、従来のリボゾームにおけるVIP製法におい

て対生物作用が向上したことを述べたが、最適成分はその製法を決定し、SSL内のVIPの対生物作用をさらに特徴づけるために、別の製法を試験した。

2つの異なるリボゾーム製法を利用した。両製法において、脂質ジステアロイル・ホスファチジルエタノールアミン (PEG-DSPE) (セクアス・ファーマスチカルス (Seques Pharmaceuticals)、メンロ・パーク、カリフォルニア)、卵黄ホスファチジルコリン (PG) (シグマ・ケミカル・カンパニー (Sigma Chemical Co.)、セント・ルイス、ミズーリ) および卵黄ホスファチジルグリセロール (PG) (シグマ・ケミカル・カンパニー (Sigma Chemical Co.)、セント・ルイス、ミズーリ) をPEGDSPE: PC: PG: Cho1モル比0.5:5:1:3.5でコレステロール (Sigma Chemical Co.)、セント・ルイス、ミズーリ) と化合した。混合物を、丸底フラスコ内のクロロホルムに混合し、溶媒を、45℃の温度で回転蒸発器 (ラブコンコ (Labconco)、カンザスシティ、ミズーリ) 内で蒸発させ、混合物を一晩真空状態で完全乾燥した。

第1の製法 (これは本発明によって企図されていない) においては、VIPが脂質成分と最初に混合され、その後押し出され、冷凍と解凍を繰り返してリボゾームを生成した。要するに、乾燥脂質フィルムは、0.4 mg VIP (アメリカン・ペプチド・カンパニー、サニーバール、カリフォルニア) を含有する250 μ l

0.15 M塩水 (0.9% w/w NaCl) で再水和した。混合物は、渦動され、172.5 W水浴超音波処理装置 (フィッシャー・サイエントフィック、イタスカ、イリノイ)、アセトンドライアイス浴槽で5回、冷凍・解凍を行った。リポゾファースト装置 (孔径200 nm、アベスチン (AVESTIN)・インタ、オクワ、オンタリオ、カナダ) を用いてポリカーボネートフィルクを介して、懸濁液を押し出した。リ

ポゾム随伴VIPを、カラムクロマトグラフィー (BioGel A-5m、バイオ・ラッド・ラボラトリーズ (Bio-Rad Laboratories)、リッチモンド、カリフォルニア) によって遊離VIPから分離し、使用するまで4℃で貯蔵した。上記の15 M270塩水溶液を用いて、カラム溶出をおこなった。ベシクルサイズは、Nicomp パーチクル・サイザー (パーチクル・サイジング・システムズ (Particle Sizing Systems)・サンタバーバラ・カリフォルニア) を用いて、準弾性光散乱 [ポアルカン・オンユクセイ (Alkan-Onyuksei) 他、J. Pharm. Sci. In press (1996)] によって決定され、この方法で生成されたリポゾムは、 224 ± 36 nmの平均直径を有することがわかった。

本発明によって企図されている第2の製法では、脂質混合物が、まず押し出され、その後、形成されたリポゾムとVIPを混合した。要するに、前記のように生成された乾燥脂質膜は、VIPの無い状態で250 ml 0.15 M塩水で再水和された。混合物は、渦動され、5分間、浴槽で超音波処理され、孔径が200 nm、100 nm、50 nmの積層されたポリカーボネートフィルクを介して押し出され、約80 nmのベシクルサイズを得た。VIP (0.4 mg) および凍結防止剤としてのトレハロース (30 mg) (シグマ・ケミカル・コーポレーション (Sigma Chemical Co.、セントルイス、ミズーリ) を粉末形状で添加し、押し出し懸濁液を形成した。混合物は、室温で2時間または4℃で一晩培養され、アセトンドライアイス槽で凍結され、およそ 5×10^{-4} ME ar の圧力で一晩、-46℃で凍結乾燥された (ラプコンコ (Labconco [Freezone 6]、カンザス、ミズーリ)。凍結乾燥した「ケーキ」は、 250μ m 脱イオン水で再懸濁された。凍結乾燥中に、VIPおよびリン脂質二重層は密接して、受動薬剤増量を促進した

(33)

特表2001-521486

。カラム分離および貯蔵条件は、上記と同

じであった。この方法で生成したリポゾームは、上記方法によって 250 ± 50 nmの平均直径を有することがわかった。これは、凍結乾燥がベシクル融解を可能にすることを示唆している。リポゾームのVIP濃度は、VIP ELISA検査道具一式（ペニンシュラ・ラボラトリーズ（Peninsula Laboratories）、バルモント、カリフォルニア）によって1%の硫酸ドデシルナトリウムを用いた処理の後に決定され、リン脂質濃度は、バーレット（Barlett）無機リン薬塩道具一式【エム・ケーツ（M. Kates）Techniques in Lipidology、ワーク・アンド・ワーク（Eds）、エルスバイアー（Elsevier）、ニューヨーク（1972）、354頁から356頁】。両方生成法に対して、およそ30%の開始VIPはリポゾームに伴伴されることが分かり、およそ50%の開始リン脂質は、回復され、回収されて、リン脂質のおよそ0.004モルVIP/モル比を与えた。

2つの型式の *in vivo* 実験を行って、2つの方法によって生成されるリポゾームにおけるVIPの血圧降下および高血圧効果を決定した。第1の連続実験では、リポゾーム製法におけるVIPの対生物作用を血管拡張作用として試験し、第2の連続実験では、平均動脈圧における2つのリポゾーム製法におけるVIPの効力を測定した。

第1の実験では、リポゾーム製法におけるVIPの対生物作用は、ハムスターの頻発における細動脈径の変化の作用として測定した。大人の雄のゴールデンハムスター（サスコ（Sasco）、オマハ、ネブラスカ）を、上記のように生成され【スズキ（Suzuki）他、Life Sci, 57（15）：1451-1457（1995）；スズキ（Suzuki）他、Am. J. Physiol, 271:11282-11287（1996）；スズキ（Suzuki）他、Am. J. Physiol, In press（1996）】、カニニューレを挿入した大腸静脈を介してベントバルビタールナトリウム（2-4 mg/体重100 g）で麻酔をかけた。大腸動脈にカニニューレを挿入し、トラン

スジューサとストリップチャートレコーダ（モデル260、グッド・インストルメント・システムズ・インク（Gould Instrument Systems Inc.、バリービュー

(32)

特許2001-521486

、オハイオ) とを用いて、全身系動脈圧および心拍数を記録した。自然位のニューロペプチドの血管作用効果を調査するために確立した動物モデルの頻震の微小循環が、上記のように視覚化された【スズキ (Suzuki) 他, *Life Sci*, 57 (15) : 1451-1457 (1995) ; スズキ (Suzuki) 他, *Am. J. Physiol*, 271: L1282-H287 (1996) ; スズキ (Suzuki) 他, *Am. J. Physiol*, In press (1996)】。ハムスクーの頻震における二次細動脈の内径は、ビデオマイクロメータ (VIA 100; ボッケラー・インスツルメンツ (Boeckeler Instruments)、タクソン、アリゾナ) を用いて顕微鏡画像のビデオディスプレイから測定された。各動物においては、実験中に同じ動脈部分を用いて直径変化を測定した。ハムスクーの頻震は、まず、30分の平衡期間に炭酸水素塩緩衝液を用いて、その後、7分間、上記の各リボゾーム製剤を0.4 ml 用いて充溢された。

第1の方法で生成されたりボゾームのVIPは、本発明の範囲外であるが、塩水に溶解された0.1モル、すなわち、およそ10%のVIPを用いて事前に報告された観察とはかなり異なる細動脈径の増加はもたらさなかった。この観察を同一方法であるが、押し出し工程のない方法が向上した延長効果を自然位で示した状態で従来のリボゾームにおけるVIPが生成された前の観察と比較すると【スズキ (Suzuki) 他, *Life Sci*, 57 (15) : 1451-1457 (1995)】、本発明によって生成されたSSLにおけるVIPの活性の損失を許容するために3つの可能性が示唆される。すなわち、押し出し工程、リビド組成、またはより小さいベシクルサイズである。本方法によって生成されたSSLが細動脈径に向上された、または延長された効果をもたらさない

と理由に関わらず、この結果は、一般にSSLが本発明に従わないことを示す際に重要となる。

第2の方法によって、しかも本発明の範囲内で生成されたりボゾームにおけるVIP (0.1モル) は、ベースライン値から細動脈径がかなり増加したことを表し、この増加は、充溢が停止した後9分から16分間継続した。この結果は、従来のリボゾームを用いた以前の観察に、より近いものであった【スズキ (Suzuki) 他, *Life Sci*, 57 (15) : 1451-1457(1995)】。

(33)

特許2001-521486

平均動脈圧での2つのリボゾーム製剤におけるVIPの持続期間および効力を試験する際に、以下の手順を行った。カナディアン・ハイブリッド・ファーム（ホールハーバー、ノバスコシア、カナダ）から、自然高血圧（ $n = 12$ ）の大人の雄のハムスターを入手した。各々がおおよそ500gの3つの試験製剤、上記第2の方法で生成されたりボゾーム、水溶液内のVIP、およびVIPのないリボゾームを、大腔静脈に、1分以上にわたって注入投与した。動物の連続麻酔は、実験期間を6時間までに制限した。

0.1モルのリボゾーム随伴VIPを注入した後、平均動脈圧が漸次的に著しく50%まで減少するのが、最初の2.5時間に観察され、この状態は、図6に示すように6時間の実験観察期間に継続した。水溶液内のVIPまたは空のリボゾームを用いた場合には、平均静脈圧の著しい効果は観察されなかった。これらのデータにより、静脈内に投与されたSSL内のVIPは、少なくとも6時間自然高血圧のハムスターの平均動脈圧をうまく正常化したことが示唆された。興味深いことに、正常血圧を生じるのに必要な投与量は、以前の観察と比較すると非常に低く、従来のリボゾームにおける同一量のVIPが正圧性ハムスターの平均動脈圧を30%低下させたが[Gao (Gao) 他, *Life Sci.* 54: PL247-PL252 (1994)]が、この観察は、VIPに対す

る自然高血圧のハムスターのより高い感度に帰する可能性がある。

本発明の方法（すなわち第2の方法）によって生成された同一組成およびサイズのSSLはVIP活性を保持したので、この結果により、第1のリボゾーム生成に対する生物作用の損失に対しては押し出しが原因であることが示唆された。この可能性は、押し出し後に25%以上の活性を失うものとしてインクルーキン2が示された前の実験証明とは一致したが[ケダー (Kedar) 他, *J Immunother.* 16: 47-59 (1994)]、押し出しによってバソプレシンはあまり影響を受けないという観察とは矛盾した[ウッド (Wood) 他, *J Pharm Res.* 9 (2): 260-265 (1992)]。

実施例4

SSLの形態学的評価

(34)

特表2001-521486

実施例3に述べられた両方の方法により調整された胞の形態学的評価のために、1996年発行のアルカン-オニユクセル (Alkan-Onyuksel) 等のジェファームエスシーアイ (J.Pharm.Sci.) にて既に報告された標準的技法による凍結破断のためにリボソームが調整された。一時的に、リボソーム懸濁液滴がフレオン22冷却された液化窒素中で凍結され、 -115°C のバルザース (Balzers) BAF301フリーズンエッチングユニットを用いて破断され、そして白金とカーボンでコーティングされた。レプリカーゼがナトリウム次亜塩素酸塩の2つの変形の最小限で洗浄され、蒸留水で洗われ、乾燥され、200メッシュの銅格子で収集され、試験され、JEOL1000透過型電子顕微鏡で80キロボルトにて撮影された。

本発明の方法により調整されたSSLの試験結果は、多胞性の胞を示しており、冷凍乾燥によっておこる、あらかじめ押し出された小さなSSLが融合し、80 nmから250 nmの平均直径での観察される増加と一致する、胞組織中で胞が形成されることを示唆している。

この観察は、SSLの冷凍乾燥/再構成工程中の既に報告された融合現象と一致する (1995年発行のスザックとチルコックとの「Nuc1.Med.Biol.22」の263~268)。おそらく、より大きな胞の形成が、小さな平均サイズの保持と長い循環時間のために要求される分配との間、最終的なリボソーム内部のVIP分子の誘導を活性化するのであろう。

実施例5

簡易化されたりボソーム調整におけるペプチド活性

この実施例によれば、生物学的活性ペプチドと結合したSSLの簡易な製造方法が提供され、それは結果的なリボソームを近似的に200 nm以下のサイズに維持するように作用する。加えて、より好ましい調整方法が試験され、そしてこの調整方法のペプチド活性上の効果が測定された。卵黄PC、卵黄PG、コレステロール及びPEG-DSPEが、クロロホルム中で、5:1:3、5:0、5のモル比で混合され、この溶剤が氷浴を用いて45℃で蒸発させられた。脂質のフィルムが夜通しで乾燥され、250 μl の塩水で阻害された。この混合物がかき回され、5分間超音波処理され、そして積み重ねられたポリカーボネートフィルタを通じてり

(35)

特表2001-521486

ポソファスト (LiposoFast) 装置を用いて押し出された。ヒトのVIPが、平均直径が300 nm以下である結果的に得られたリポソームに添加され、そしてこの混合物が4℃で夜通し保持された。フリーのVIPが、バイオゲルA-5mカラムを用いて、VIP結合リポソームから分離され、収集されリポソームが、使用されるまでの間、4℃のアルゴン下で貯蔵された。ある意味での電子光散乱により測定されたリポソームのサイズは、162 nmプラスマイナス59 nmの平均直径を示した。リン脂質濃度とVIP回収率とが前述のように測定され、44%のVIPとVIPが与えられた50%のリン脂質とが見出された。リン脂質のモル比は0、

006であった。

大人の高血圧のゴールドンシリアンハムスターが、それぞれ前述の技法による生体内顕微鏡観察、観察され測定される頻袋の微小循環及び測定される動脈血圧のために用意された。測定は、VIP水溶液の投与、前述のように調整されたSSL内のVIP及びVIPの無いSSLによってなされた。

7分間のSSL中のVIPの紅潮が、大幅で、濃度に依存した、そして長期に渡る小動脈直径の増加とともに見られた。大幅な血管拡張は紅潮の開始から1分間観察され、初期の5分間は最大であった。小動脈直径は、紅潮終了後8分間で通常レベルに戻った。水溶液のVIP及び空のSSLは、全く効果がなかった。

SSL中のVIPはまた、血管の血圧の大幅な低下を顕在化し、その最大効果は紅潮の開始から30分間観察された。血圧は、6時間の観察期間中低めに維持された。上記と同様、水溶液のVIP及び空のSSLは、全く効果がなかった。

この結果は、実施例3で述べられた脱水/再水和ステップが、活性リポソーム調整の構成に必ずしも必要ではないことを示した。より重要なことに、この方法によって調整されたリポソームが200 nm以下の平均直径を維持し、そして、実施例3で述べられたいずれのリポソーム調整よりも高くはないにしても同等のVIP活性を維持した。さらなる利点として、この調整方法から得られたVIP：リン脂質の比が、実施例3の方法と比べた際に高い(0、006対0、004)。

実施例6

音波反射評価におけるSSL

(36)

特許2001-521486

VIPを含むSSLが調整され、以下の音波反射測定を用いたイメージングに供された。

実施例3にて述べられたように調整されたりボソームが液体シンチレーション瓶に移され、20MHzの高周波血管超音波（IVUS）イメージングカテーテル（ポストンサイエンティフィック社のサニーバール，CA）でイメージされた。このIVUSカテーテルは瓶のキャップを通して、そして固定された。利得、ズーム、圧縮及び拒絶レベルのためにセットされた器具は、実験開始時に最適化され、すべてのサンプルについて一定に保持された。イメージは1/2インチVHSビデオテープに、後の再生とイメージ分析とのために、リアルタイムに記録された。リボソームフォーミュレーションの相対的なエコー発生性（明白な明るさ）が、コンピュータ支援濃度計によって他覚的に査定された。工程は、入手、前工程、自動化されたりボソーム同定及びグレースケール定量化を含んだ。イメージ工程及び分析は、専用のコンピュータ（486CPU、66MHz）上で起動するイメージプロプラスソフトウェア（Ver1.0、メディアサイバーネティクス、シルバースプリング，MD）にて遂行された。無作為に選択されたIVUSイメージが、それぞれのリボソームフォーミュレーションのビデオテープから獲得された。イメージは、640×480画素領域解像度（近似的には0.045mm/画素）及び8ビット（256レベル）の大きさの解像度にデジタル化された。すべての分析されたIVUSデータは、固定された器具の獲得レベルにて収集された。そして、イメージ内のグレースケール値の分布は、リニアトランスフォーメーションアルゴリズムを用いた可能なグレースケールの全範囲をカバーするように調整された（すなわち、ダイナミックレンジは最大化された）。イメージの明度は主観的に拡張されて、参照の特徴は、すべてのイメージに共通して、すべてのイメージに渡ってのグレースケール値は一定に維持された。そして、自動化されたりボソーム検出ルーチンは、イ

メージカテーテルから半径方向に一定距離離れてセットされた関連の環状領域内で、溶剤中で懸濁されたりボソームの同定のために起動された。自動化されたり

(37)

特許2001-521486

ポソーム検出ルーチンは、2.9より大きなグレースケールレベル、2.5以下の円比率（すなわち最大直径と最小直径との比率）、及び4画素以上のサイズを有する分析域内のすべての明るい対象を同定した。この手順は、検出アルゴリズムから全てのイメージを構築を完了的に排除した。従って、同定された対象は「リボソーム」と考えられる。それぞれのリボソームは、コンピュータプログラムによって輪郭が画かれ、数えられた。そして、与えられたイメージで「リボソーム」と同定された全ての画素の各値のグレースケール及びサイズの平均は、算出され、そして、与えられたリボソームフォーミュレーションのエコー発生性の特徴づけるために用いられた。これらの実験結果は、VIPリボソーム調製の音波反射が119のグレースケール（純粋な黒である0から純粋な白である255までのグレースケールにおける）を有することを示す。FCT公報W093/20802に述べられた凍結乾燥方法を用いて製造されたより大きなリボソームは約110~120の音波反射で特徴づけられ、Aibunex（登録商標）のような対照媒体を備えたリボソームは約110~120の音波反射を有する。すなわち、本発明は、その聴覚的イメージ資産を維持しつつ、小さな直径のリボソームを提供する。

以上例示された実施例での開示により、本発明の多くの改良や変更が当業者に起こることが予見される。従って、添付クレームに示されたような限定のみが、本発明に位置づけられるべきである。

(38)

特許2691-521486

【図1】

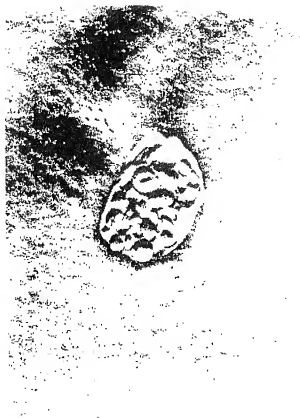
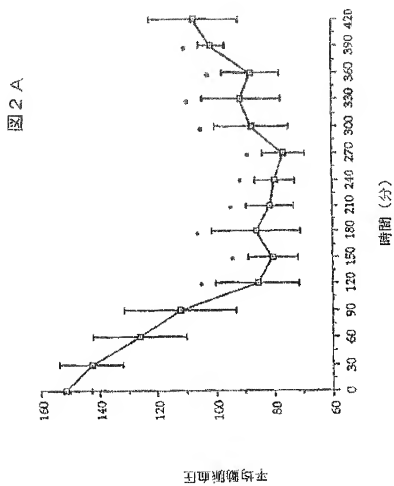


図 1

(39)

特許2691-521486

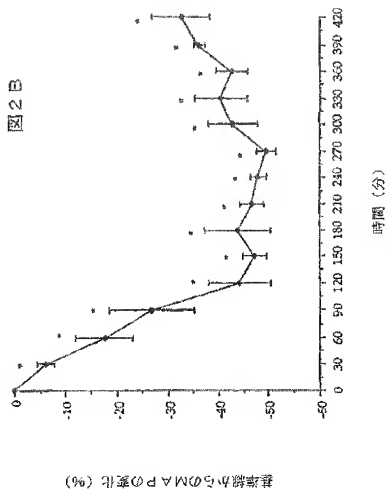
[図2]



特表2001-521486

(40)

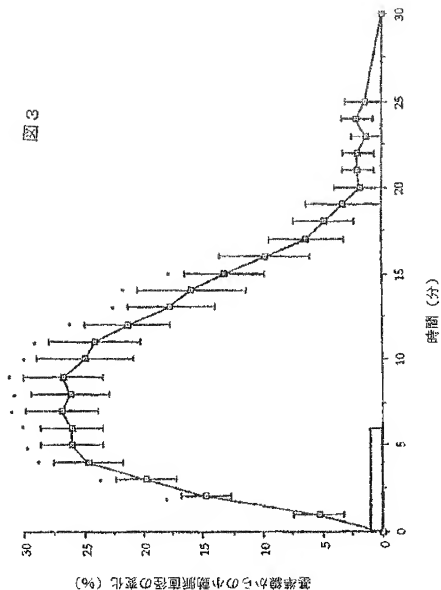
[図2]



(41)

特表2001-521486

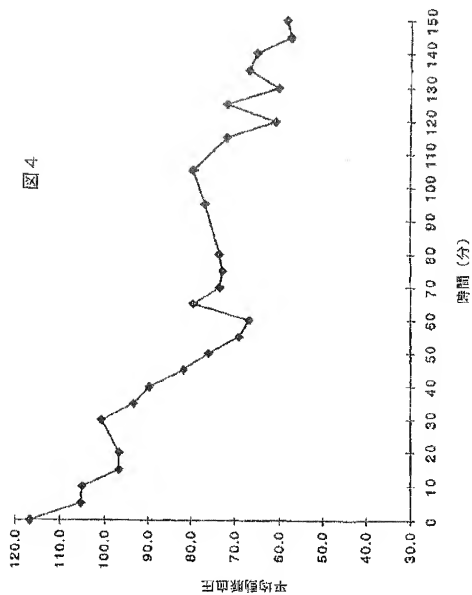
[図3]



(42)

特表2001-521486

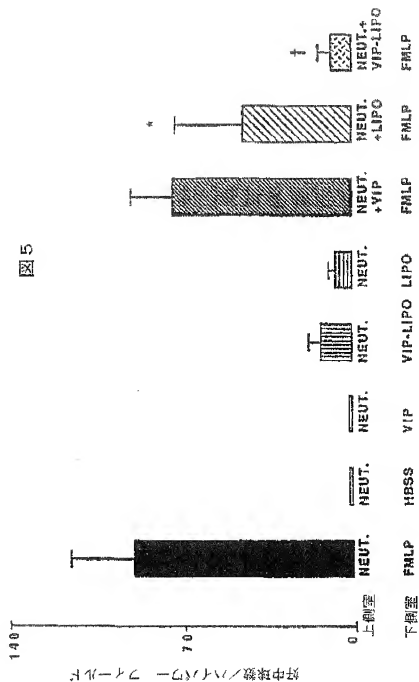
【圖4】



(43)

特許2001-521486

【図5】



(44)

特表2009-521486

【図6】

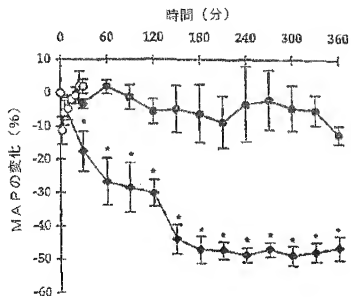


図6

(45)

特蔵 2001-521486

[国際調査報告]

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP97/0501

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC66 A61K 9/27, 9/33

US CL. 424/450, 264/1, 4.3

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC.

B. PUBLIS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

U.S. 424/450, 264/1, 4.3.

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
NONE

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

APS

Search terms: liposomes, proteins or peptides, insertion or inserted, PEG.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 5,225,212 A (MARTIN et al) 06 JULY 1993, abstract, column 3, line 1 through column 4, line 10; column 10, line 5 through column 11, line 62 and claims.	1-32
Y	US 5,374,548 A (CARAS) 20 DECEMBER 1994, Example 4.	1-32
Y	KIRBY et al. "Dehydration-rehydration vesicles: a simple method for high yield drug entrapment in liposomes." Biotechnology, November 1984., pages 979-984, especially pages 979 and 983.	4

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family notes.

* Documents of the following categories:

"A" documents defining the general scope of the invention and considered to be of particular relevance

"B" earlier documents published on or after the international filing date

"C" documents which may then decide on priority claims or which are cited to establish the existence and/or content of another document

"D" documents relevant to an oral disclosure, use, exhibition or other manner

"E" documents published prior to the international filing date but not then available to the public

"F" late documents published after the international filing date or priority date and not known to the applicant at said date when the priority or priority claim was made

"G" documents of particular relevance, but without document number or classification number, referred to in the search report

"H" documents of particular relevance, the claimed invention cannot be considered to derive an inventive step when the document is combined with one or more other publications, such combination being obvious to a person skilled in the art

"I" documents, number of the same given orally

Date of the actual completion of the international search

26 MAY 1997

Date of mailing of the international search report

07 AUG 1997

Name and mailing address of the ISA/US

Coordinator of Patent and Trademark

Box 101

Washington, D.C. 20531

Authorized officer

GOLAMUDDIN S. KISHORE

Filing No. (703) 205-2230

Telephone No. (703) 205-2230

Form PCT/ISA/210 (second sheet) July 1992

(46)

特表2001-521486

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP97/05101

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	GAO et al. "Vasoactive intestinal peptide encapsulated in liposomes: Effects on systemic arterial blood pressure", Life Sciences, 1994, Vol. 54, No. 15, pages 247-252, especially page 247 and 248.	7, 8 & 27-32

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet)(July 1992)*

(47)

特表2001-521488

フロントページの続き

(72)発明者 ルービンスタイン、イスラエル
アメリカ合衆国 60635 イリノイ ハイ
ランド パーク レキシントン レーン
2999